



Docket No.: 21581-00303-US  
(PATENT)

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of:  
Hidenori Yamada et al.

Application No.: 10/671,881

Confirmation No.: 5366

Filed: September 29, 2003

Art Unit: 1645

For: TEST KIT FOR INTRACELLULAR  
INTRODUCTION OF PROTEIN AND/OR  
PEPTIDE AND METHOD OF  
INTRACELLULAR INTRODUCTION

Examiner: Not Yet Assigned

**CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENT**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Japan	2002-287280	September 30, 2002

In support of this claim, a certified copy of the said original foreign application is filed herewith.

Application No.: 10/671,881

Docket No.: 21581-00303-US

Applicant believes no fee is due with this response. However, if a fee is due, please charge our Deposit Account No. 22-0185, under Order No. 21581-00303-US from which the undersigned is authorized to draw.

Dated: February 18, 2004

Respectfully submitted,

By   
Burton A. Amernick

Registration No.: 24,852  
CONNOLLY BOVE LODGE & HUTZ LLP  
1990 M Street, N.W., Suite 800  
Washington, DC 20036-3425  
(202) 331-7111  
(202) 293-6229 (Fax)  
Attorney for Applicant

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 2 年    9 月 3 0 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 2 - 2 8 7 2 8 0  
Application Number:  
[ST. 10/C] :                      [ J P 2 0 0 2 - 2 8 7 2 8 0 ]

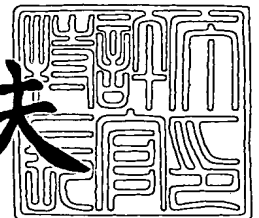
出      願                      人                      株式会社日本触媒  
Applicant(s):



2 0 0 3 年    9 月 3 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-0735

【提出日】 平成14年 9月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C08G 73/04

【発明の名称】 蛋白質又はペプチドの細胞内導入方法

【請求項の数】 4

【発明者】

    【住所又は居所】 岡山県岡山市門田屋敷 2 - 2 - 5 5 - 2 - 2 0 4

    【氏名】 山田 秀徳

【発明者】

    【住所又は居所】 岡山県岡山市福田 1 0 1 9 - 1 0

    【氏名】 二見 淳一郎

【発明者】

    【住所又は居所】 岡山県岡山市津島本町 1 0 - 1 - 1 0 2

    【氏名】 前田 貴志

【発明者】

    【住所又は居所】 岡山県岡山市西市 4 4 2 - 4 - 1 0 5

    【氏名】 北添 翠

【特許出願人】

    【識別番号】 000004628

    【氏名又は名称】 株式会社 日本触媒

【代理人】

    【識別番号】 100091096

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 平木 祐輔

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100101904

【弁理士】

【氏名又は名称】 島村 直己

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9406568

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛋白質又はペプチドの細胞内導入方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 蛋白質又はペプチド (a) と 2 を超えて 3 万以下のカチオン価を有する重合体 (b) とが結合した複合体 (A) を蛋白質又はペプチド (c) のキャリアーとして用いて、該蛋白質又はペプチド (c) を細胞内に輸送することを特徴とする蛋白質又はペプチドの細胞内導入方法。

【請求項 2】 前記蛋白質又はペプチド (a) が抗体である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記蛋白質又はペプチド (a) がプロテイン A 又はプロテイン G である請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 前記蛋白質又はペプチド (a) がアビジン類である請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な蛋白質複合体、及び該複合体を用いて蛋白質を細胞内に効率的に導入する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

細胞内で任意の蛋白質を機能させる技術は、現在のところ遺伝子導入法がほぼ唯一の手法となっている。恒常的に細胞内で任意の蛋白質を機能させたい場合は遺伝子導入法が有利な手法ではあるが、任意の蛋白質を一過的に細胞内で機能させたい場合は蛋白質そのものを細胞内に導入することが好ましい。

【0003】

従来、蛋白質そのものを細胞内へ導入する方法としては、細胞膜を透過させる必要があることから、マイクロインジェクション等の特殊な手法や、リポソーム等のカプセル状のものに蛋白質を封入し、それを細胞膜に融合させることにより内容物 (蛋白質等) を細胞内に導入する手法が用いられている。また、細胞の種

類は限定されるものの、細胞表面に発現する各種のレセプターを標的とし、そのリガンドをキャリアーとしたレセプター依存経路による細胞内導入法も実用化されている。

#### 【 0 0 0 4 】

我々は最近、これらの経路以外にカチオン性の高い蛋白質や化学修飾によりカチオン化された蛋白質が、負に帯電している細胞表面に静電的に吸着し、高効率に細胞内に取り込まれることを確認した(例えば、非特許文献 1 参照)。同じく最近、HIV由来の塩基性に富むTATペプチド(例えば、非特許文献 2 参照)やPoly-Arg等のカチオン性ペプチド(例えば、非特許文献 3 参照)を付加した蛋白質が細胞膜を効率的に透過することが報告された。何れも詳細なメカニズムは不明ではあるが、カチオン性蛋白質と細胞表面との静電相互作用に起因する経路による細胞膜透過経路が考えられる。

#### 【 0 0 0 5 】

しかしながら、従来の蛋白質のカチオン化による手法では、蛋白質分子内の多部位のアミノ酸側鎖の修飾が必要であったため、機能低下の問題があった。

#### 【 0 0 0 6 】

カチオン性ポリマーを蛋白質に 1 ～数個以内の少数の側鎖の修飾で、蛋白質をカチオン化することにより、機能低下が軽微に抑制されることを見いだしているが(特願 2 0 0 2 - 1 5 6 1 9 7)、蛋白質機能への影響や細胞内局在への影響が問題であった。

#### 【 0 0 0 7 】

##### 【非特許文献 1】

二見等、「バイオケミストリー」(Futami et al., Biochemistry), 40, p.7518-7524, 2001

##### 【非特許文献 2】

シュワルツ等、「サイエンス」(Schwarze et al., Science), 285, p.1569-1572, 1999

##### 【非特許文献 3】

二木等、「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー」(Futak

i et al., J. Biol. Chem.), 276, p.5836-5840, 2001

#### 【0008】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、細胞内に蛋白質をその機能・構造を損なうことなく導入することができる複合体、及び、該複合体を用いて、時間的・量的に制御でき、なおかつ効率的に蛋白質を細胞内へ導入する方法を提供することを目的とする。

#### 【0009】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するべく検討を重ねた結果、カチオン性ポリマーと蛋白質又はペプチド(a)の複合体をキャリアーとして用い、導入目的物である蛋白質又はペプチド(c)を、複合体(A)と可逆的な非共有結合等で結合させ、これを細胞と接触させることにより細胞内に蛋白質(c)を効率的に、且つ蛋白質(c)の構造及び機能を維持したまま導入できることを見だし本発明を完成させるに至った。

#### 【0010】

即ち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 蛋白質又はペプチド(a)と2を超えて3万以下のカチオン価を有する重合体(b)とが結合した複合体(A)を蛋白質又はペプチド(c)のキャリアーとして用いて、該蛋白質又はペプチド(c)を細胞内に輸送することを特徴とする蛋白質又はペプチドの細胞内導入方法。

(2) 前記蛋白質又はペプチド(a)が抗体である前記(1)記載の方法。

(3) 前記蛋白質又はペプチド(a)がプロテインA又はプロテインGである前記(1)記載の方法。

(4) 前記蛋白質又はペプチド(a)がアビジン類である前記(1)記載の方法。

。

#### 【0011】

##### 【発明の実施の形態】

以下に本発明を詳細に説明する。

本明細書でいう「蛋白質又はペプチド」とは、2個以上のアミノ酸がペプチド



結合により結合して生じる化合物を意味する。本発明で用いることのできる蛋白質又はペプチドとしては特に限定されず、ペプチド、酵素、その他機能性（生理活性）を有する蛋白質等の任意の蛋白質又はペプチドを用いることができ、その分子量としては100～100万が好ましい。なお、本明細書でいう「蛋白質」とは、その蛋白質に、糖鎖、脂質、及び／又はリン酸基が結合した複合蛋白質をも含む意味である。また、その蛋白質の構造は天然状態であっても変性状態であってもよい。

#### 【0012】

本発明で用いられる、蛋白質又はペプチド（a）（以下、蛋白質（a）という）と重合体（b）との複合体（A）としては、細胞内に導入しようとする蛋白質又はペプチド（c）（以下、蛋白質（c）という）と可逆的に結合又は会合できるものが好ましい。そのような蛋白質（a）としては、抗体結合能を有する蛋白質又はペプチド、例えば各種の抗体のサブクラス：IgGのFcフラグメントに結合することが知られているプロテインA及びプロテインG等が挙げられる。また、蛋白質（a）として、卵白由来のアビジン、菌体由来のストレプトアビジン等のアビジン類等も挙げられる。

#### 【0013】

さらに、本発明では、複合体（A）と直接蛋白質（c）とが可逆的に結合又は会合しなくても、例えば、複合体（A）と蛋白質（c）とが可逆的に結合又は会合できるようなスペーサーを介して複合体（A）と蛋白質（c）とが可逆的に結合又は会合する形態も好ましい。このような例としては、蛋白質又はペプチド（a）（以下、蛋白質（a）という）としてはアビジン等が挙げられ、そして、スペーサーとしてはビオチンを用いることが挙げられる。ビオチンをスペーサーとして用いる場合には、例えば、細胞内に導入しようとする蛋白質（c）を市販のビオチン化試薬等を用いて公知の方法により処理することにより蛋白質（c）にビオチン基を導入することができる。

#### 【0014】

また、本発明で用いられる蛋白質（a）、重合体（b）又は蛋白質（c）を、必要に応じて標識することが好ましい。標識方法としては、一般的な公知の方法であ

れば特に限定されないが、蛍光標識、オートラジオグラフィ、高電子密度物質、色素不溶化酵素であることが好ましい。特に好ましい形態は、蛍光標識を共有結合により複合体(A)、蛋白質(c)を標識することである。

#### 【0015】

蛍光標識に用いる蛍光物質としては、特に限定されないが、例えばピレン、アントラニロイル基、ダンシル基、フルオレセイン、ローダミン、ニトロベンゾキサジアゾール基等の蛍光団を有する化合物が挙げられる。上記の蛍光団を有する化合物は公知であり(例えば、平塚寿章、「蛋白質 核酸 酵素」、Vol.42, No.7(1997)等参照)、常法により蛋白質分子又はペプチド等に導入することができる。

#### 【0016】

本発明で用いることのできるカチオン性の基を有する重合体(b)としては、例えば、2を超えて3万以下のカチオン価を有する重合体が挙げられる。本明細書でいう「カチオン価」とは、前記重合体のアミン価(mmol/g)と前記重合体の数平均分子量との積を1000で割った値のことである。本発明で用いられる前記重合体のカチオン価は一般に2を超えて3万以下であるが、2を超えて2万以下が好ましく、2を超えて2500以下がより好ましく、2を超えて250以下が特に好ましく、4以上70以下が最も好ましい。なお、「アミン価(mmol/g)」とは試料化合物中に含まれるアミンの総量の指標であり、試料化合物1gに含まれるアミンのmmol数で表される。試料化合物のアミン価は一般的なアミノ基の定量方法に従って測定できる。一般的なアミノ基の定量方法としては、「新実験化学講座 第13巻 有機化学構造I」(丸善株式会社発行、日本化学会編、昭和53年11月20日発行)の第88頁～第99頁に記載の方法やコロイド滴定法を挙げることができる。コロイド滴定法は、「コロイド滴定法」(株式会社南江堂発行、千手諒一著、第1版1969年11月20日発行)に記載されている。アミン価の分析は試料化合物の形態、溶解性、含有不純物等を考慮して、精度よく分析できる方法を適宜選択する必要がある。本発明で用いられる重合体のアミン価は特に限定されるものではないが、1～30が好ましく、5～25がさらに好ましい。

#### 【0017】

また、本発明で用いられる重合体 (b) の数平均分子量としては、一般に 100~100 万であるが、100~10 万が好ましく、100~1 万が更に好ましく、200~3000 が特に好ましい。なお、重合体の数平均分子量の測定にあたっては、重合体の数平均分子量が 1 万以下の場合は沸点上昇法により測定し、1 万を超える場合は GPC により測定すると分子量を精度よく測定できる。

#### 【0018】

本発明で用いることのできる重合体 (b) としては、例えば、ポリアルキレンポリアミン骨格、ポリアリルアミン骨格、ポリビニルアミン骨格、ポリ (メタ) アクリル酸ジアルキルアミノアルキルエステル骨格、ポリ (メタ) アクリル酸ジアルキルアミノアルキルアミド骨格、ポリアミジン骨格、ポリビニルピリジン骨格、若しくはポリビニルイミダゾール骨格を有する重合体、又はこれらの共重合体を挙げることができる。また、それらの重合体の塩、例えば、第一級、第二級、第三級、及び第四級アンモニウム塩等も同様に用いることができる。更にこれらの重合体を化学的に修飾、変成した重合体も同様に用いることができる。

#### 【0019】

そのような重合体 (b) の具体例としては、例えば、ポリエチレンイミン、ポリプロピレンイミン等のポリアルキレンイミン等のポリアルキレンポリアミン、ポリアリルアミン、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライド等のポリアリルアミン、ポリアクリルアミドのホフマン分解物、ポリビニルアセトアミド加水分解物、ポリビニルフタルイミドの加水分解物、N-ビニルホルムアミドポリマーの加水分解物等のポリビニルアミン、ジメチルアミノプロピル (メタ) アクリルアミド (共) 重合体等のジアルキルアミノアルキル (メタ) アクリルアミド (共) 重合体、ポリメタアクリロイルオキシエチルトリメチルアンモニウムクロライド等のジアルキルアミノアルキル (メタ) アクリレート (共) 重合体、ポリアミジン、ポリビニルピリジン、ポリビニルイミダゾール、ジシアンジアミド系縮合物、エピクロロヒドリン・ジメチルアミン縮合物等のエピクロロヒドリン・ジアルキルアミン縮合物、ジメチルアミン・エチレンジクロライド縮合物等のジアルキルアミン・アルキルジハライド縮合物、ポリビニルイミダゾリン、ポリビニルベンジルトリメチルアンモニウムクロライド、カルボキシメチルセルロース第

四級アンモニウム（第四級アンモニウムCMC）、グリコールキトサン、カチオン化デンプン等が挙げられる。

### 【0020】

上記重合体のうち代表的な化合物のアミン価の理論値は以下の表のとおりである。本表に記載のアミン価の理論値とは、重合体を形成する単量体の分子量の逆数に1000をかけた値である。一般的に、上記の方法により測定されるアミン価の実測値はその理論値と測定誤差の範囲内ではほぼ一致する。上述の方法により測定されるアミン価に基づいて重合体のカチオン価を算出することができる。アミン価は重合体の合成方法を変更したり、他成分との共重合、重合体の化学的修飾により任意に変化させることが可能である。

### 【0021】

【表1】

	アミン価 (mmol/g) *
ポリエチレンイミン	23
ポリビニルアミン	23
ポリアリルアミン	17
ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライド	6.2
ポリメタアクリロイルオキシエチルトリメチルアンモニウムクロライド	4.8
ポリメタアクリロイルアミノプロピルトリメチルアンモニウムクロライド	4.5
ポリアミジン	6.0
ポリビニルベンジルトリメチルアンモニウムクロライド	6.3
ポリビニルピリジン	10
ポリビニルイミダゾリン	11
エピクロロヒドリン・ジメチルアミン縮合物	7.2
ジメチルアミン・エチレンジクロライド縮合物	9.3

\* : 理論上の最大値

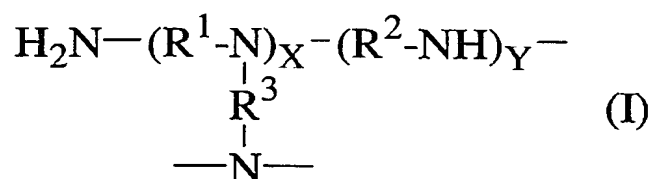
### 【0022】

以下に、本発明で用いられる複合体（A）の製造方法について述べる。重合体（b）として、例えばポリアルキレンイミンを用いる場合、以下のようにして複合体（A）を製造することができる。

### 【0023】

ポリアルキレンイミン（重合体（b））としては、例えば下記一般式（I）：

## 【化1】



(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、及び $\text{R}^3$ はアルキレン基を表し、 $X$ 及び $Y$ はそれぞれ0以上の整数であり、 $X$ と $Y$ の和は1以上である。)

で表され、直鎖状のもの、又は、枝分かれ状のものどちらであってもよい。

## 【0024】

前記ポリアルキレンイミンは、式(I)中の $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、及び $\text{R}^3$ が互いに同一でも異なってもよい炭素原子数2~4のアルキレン基であるポリアルキレンイミンが好ましく、さらには式(I)中の $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、及び $\text{R}^3$ が炭素原子数2のエチレン基であるポリエチレンイミンがより好ましい。

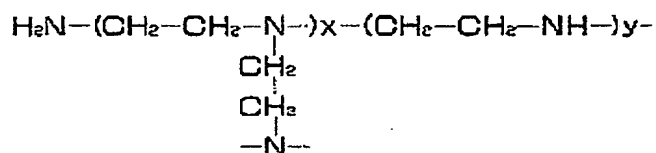
## 【0025】

以下に、ポリエチレンイミンを用いる場合についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではなく、これ以外のその他のポリアルキレンイミン等の重合体(b)についても以下と同様にして実施することができる。

## 【0026】

本発明で好ましく用いられるポリエチレンイミン(以下、「PEI」という)は下記式で表される。

## 【化2】



(式中、X及びYはそれぞれ1以上の整数である。)

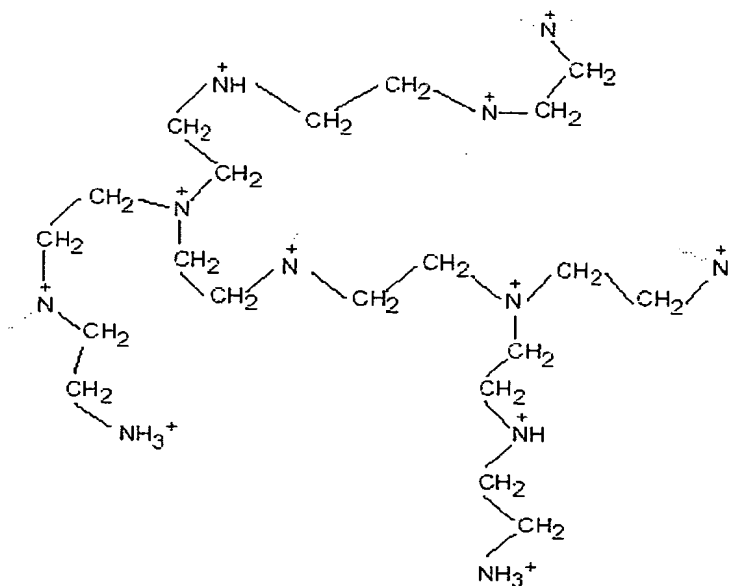
【0027】

PEIは、大きな正の電荷密度を有する水溶性ポリマーである。なお、PEIはかまぼこの沈殿剤等の食品添加物としても利用されており、生体に対する安全性が確認されている。

【0028】

本発明では、直鎖状のPEIでも分岐鎖を多数有する枝分かれ構造のPEIでも用いることができるが、下記式：

【化3】



で例示されるような枝分かれ構造を有するPEIが、より正電荷密度が高いことから好ましい。また、分子量は細胞導入効率、取扱い性等を考慮すると、数平均分子量が100～100,000の範囲のPEIが好ましく、100～10,000のPEIがより好ましく、200～3,000の低分子量のPEIが特に好ましい。

【0029】

本発明で用いられる複合体(A)は、前記蛋白質(a)と前記PEI等の重合体(b)とが結合したものである。蛋白質(a)と重合体(b)とはそれらの間に何も介さずに直接的に結合していてもよいし、又は、公知の2価性架橋試薬等を用いて、間にスペーサー等を介して結合していてもよい。一分子の蛋白質(a)

に対して結合する重合体 (b) の分子数は特に限定されないが、1～10個が好ましく、1～3個が特に好ましい。また、個々の重合体 (b) における蛋白質 (a) との結合部位数は1点であることが好ましい。本発明では、1個の蛋白質 (a) に対して1個の重合体 (b) が1点だけで結合した複合体 (A) が特に好ましい。

### 【0030】

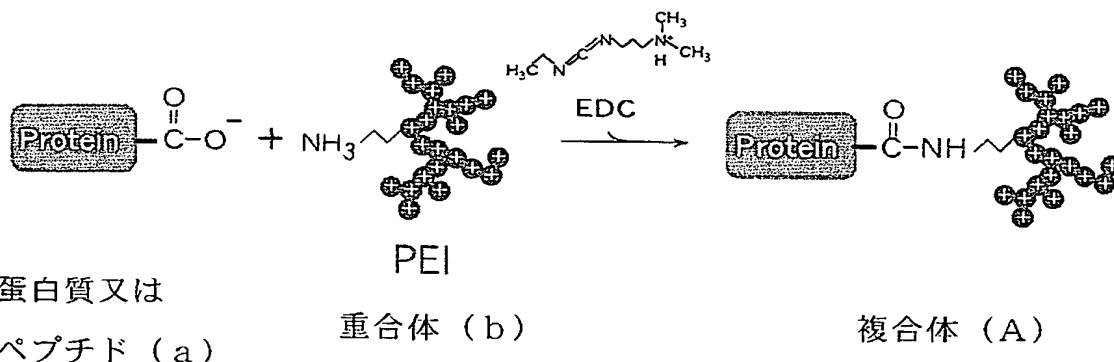
重合体 (b) がPEIである場合、蛋白質 (a) とPEIとの間の結合は、蛋白質 (a) とPEIとを結合させることができるものであれば特に限定されるものではなく、化学分野で公知の合成手法を利用することにより様々な結合方法で結合させることができる。以下に、蛋白質 (a) とPEIとの結合方法について例示するが、本発明で用いられる結合方法はこれらに限定されるものではない。

### 【0031】

蛋白質 (a) とPEIとをアミド結合を介して結合する場合には、例えば、EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)、DCC (N,N-ジシクロヘキシルカルボジイミド) 等の活性化剤を用いて、蛋白質分子中のアスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、又は炭素末端のカルボキシル基とPEIのアミノ基との間にアミド結合を形成させることができる。EDCを用いた場合の例を下記に模式的に示す。

### 【0032】

#### 【化4】

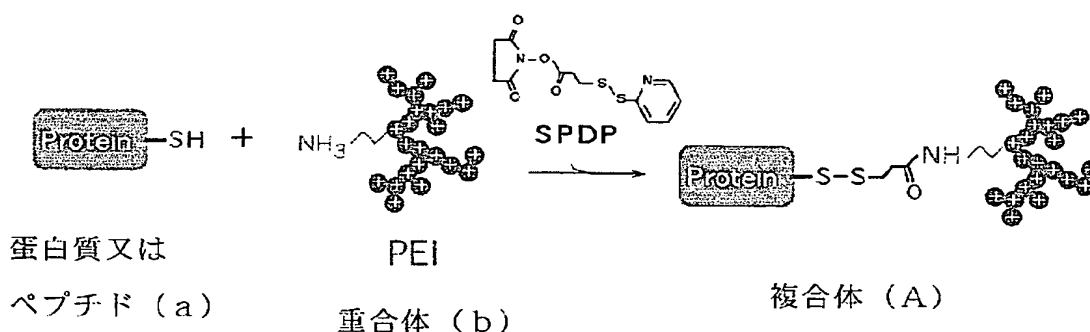


## 【0033】

蛋白質 (a) とPEIとをジスルフィド結合を介して結合する場合には、例えば、SPDP (N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート) 等の試薬を用いて、蛋白質分子中のシステイン残基のチオール基とPEIのアミノ基との間にジスルフィド結合を含む共有結合を形成させることができる。SPDPを用いた場合の例を下記に模式的に示す。

## 【0034】

## 【化5】



## 【0035】

この他に、蛋白質 (a) とPEIとを結合させる例としては、2-イミノチオラン等を用いて、蛋白質分子中のリジン残基又はN末端のアミノ基とPEIのアミノ基とを結合させる方法や、GMBS (N-(4-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド) 等を用いて、蛋白質分子中のシステイン残基のチオール基とPEIのアミノ基との間にチオエーテル結合を含む共有結合を形成させる方法等が挙げられる。

## 【0036】

ここで挙げた結合方法以外にも、エーテル結合、エステル結合、イミド結合、炭素-炭素結合、アミジン結合等が挙げられ、文献 (例えば、株式会社 東京化学同人「蛋白質IV 構造機能相関」 社団法人 日本生化学会 編、第1版1991年3月20日 発行) 等を参照することにより、様々な結合方法を採用して複合体 (A) を製造することができる。

## 【0037】

上述の製造方法及び当技術分野で公知の合成手段を参照することにより、ポリ



アルキレンイミン以外の重合体を用いた場合についても同様に複合体 (A) を製造することができる。

#### 【0038】

上述の複合体 (A) を用いて蛋白質 (c) を細胞内に導入する方法は以下のようにして行われる。

#### 【0039】

まず、本発明で用いられる複合体 (A) を細胞内に導入しようとする蛋白質 (c) と結合又は会合させる。

#### 【0040】

蛋白質 (c) は、複合体 (A) 中の蛋白質 (a) 部分と結合又は会合させることが好ましい。さらに、この結合又は会合は可逆的な非共有結合であることが好ましい。このような結合又は会合としては、蛋白質とその蛋白質に対するリガンドとの関係を挙げることができる蛋白質のリガンドとは、例えば酵素とそれに対する基質又は補酵素、抗体に対する抗原、或いはアビジンやストレプトアビジンに対するビオチンのように特定の蛋白質に親和性を有し、その蛋白質に非共有結合的に結合又は会合する化合物である。このような結合又は会合としては、例えば、ブドウ球菌由来プロテイン G 又はプロテイン A と各種哺乳類等の抗体のサブクラス: IgG の Fc フラグメントとの結合や、アビジンとビオチンとの結合、抗体の Fc 部位を認識する 2 次抗体と 1 次抗体との結合などが挙げられ、これらの結合を利用して細胞内に導入しようとする蛋白質 (c) を複合体 (A) の蛋白質 (a) に結合させる。即ち、例えば、細胞内に導入しようとする蛋白質 (c) が抗体である場合には、蛋白質 (a) として抗体結合性の蛋白質を採用し、または蛋白質 (c) に対して 1 次抗体と 2 次抗体との関係にあるような蛋白質を蛋白質 (a) として採用する。あるいは、蛋白質 (c) としてビオチン化蛋白質を用いる場合には、蛋白質 (a) としてアビジンを採用すればよい (例えば、図 1 参照)。このように蛋白質 (c) に対して親和性を有する蛋白質又はペプチドを蛋白質 (a) として採用することにより、蛋白質 (a) が結合した複合体 (A) と蛋白質 (c) とを混合するだけで蛋白質 (c) は複合体 (A) 中の蛋白質 (a) に結合又は会合する。

## 【0041】

さらに、複合体（A）と蛋白質（c）との結合又は会合は、細胞内で開裂する結合又は会合を選択することも本発明の好ましい形態である。細胞内で開裂する結合又は会合には、例えば、複合体（A）と蛋白質（c）との間に導入したスペーサー部位で開裂する形態も含まれる。

## 【0042】

次に、蛋白質（c）が結合した複合体（A）をキャリアーとして用いて細胞内に蛋白質（c）を導入する方法について説明するが、本発明の方法はこれらに限定されるものではない。

## 【0043】

蛋白質（c）を導入しようとする細胞を含む培地中に、蛋白質（c）が結合した複合体（A）又はそれを含む溶液を添加する。その後、細胞を適切な培養温度、培養時間等の培養条件で培養することにより、蛋白質（c）が結合した複合体（A）は細胞内に取り込まれ、時間の経過とともに該複合体（A）の細胞への取り込み量は増加する。本発明の方法では、蛋白質（c）が結合した複合体（A）の添加量、添加濃度、添加時間等を変化させることにより蛋白質（c）の細胞内への導入量を容易に制御できる。なお、本発明の複合体は、該複合体が有する正電荷と細胞表面の負電荷との静電相互作用に起因する機構により細胞内へ取り込まれるものと推測され、このため、培地中で細胞に複合体を取り込ませる場合には、ヘパリン、核酸等のアニオン性ポリマーが共存しない条件下で行うことが好ましい。また、本発明の複合体を含む溶液を、例えば経口投与、静脈内投与、患部への注射、皮膚への塗布等の方法により直接生体に接種して、生体内の細胞に複合体を取り込ませることもできる。

## 【0044】

## 【実施例】

以下の参考例 1～3 及び実施例 1 のようにして、蛋白質（a）としてビオチン及び／又はアビジンを、その蛋白質（a）をカチオン化するための重合体（b）として PEI を、そして細胞内に導入する蛋白質（c）として eGFP を用いて実験を行った。

## 【0045】

(参考例 1) ビオチン化eGFPの調製

蛋白質として、細胞内への取り込みが蛍光により容易に確認できるEnhanced Green Fluorescent Protein (eGFP: CLONTECH社製)を用いた。eGFPはアミノ末端にHisタグを含み、大腸菌リコンビナント蛋白質として発現・精製したものである。PBSに2.5mg/mlの濃度でeGFPを溶解した。DMFに2mg/ml濃度になるよう溶かしたビオチン-AC<sub>5</sub>-OSu (同仁化学社製) 37.9  $\mu$ lをeGFP溶液に添加してボルテックスミキサーで30秒間攪拌後、室温で3時間インキュベートした。反応溶液をゲルろ過クロマトグラフィー (PD10) で精製して、ビオチン化eGFPを得た。

## 【0046】

(参考例 2) ビオチン-PEI複合体の調製

ビオチン化PEIは次の手順で調製した。30mg/mlのPEI (分子量600: カチオン価 12) 水溶液418  $\mu$ l (塩酸でpH8に調製) に1mg/ml濃度のビオチン-AC<sub>5</sub>-OSu (DMFに溶解) を76  $\mu$ l添加した。反応は室温で7時間インキュベートした後、反応終了後、使用するまで4℃で保存した。なお、ビオチン化PEIの濃度はビオチンの最終濃度である33.8mMとした。

## 【0047】

(参考例 3) アビジン-PEI複合体の調製

60mg/ml濃度のPEI (分子量600: カチオン価 12) の水溶液 1ml (塩酸でpH5に調整) にアビジン 1mgを溶解した。EDC 30mgを添加してボルテックスミキサーで30秒間攪拌後、室温で16時間インキュベートした。反応溶液を水に対して透析し、凍結乾燥した後、0.5Mのヒドロキシルアミン溶液 1mlに溶かし、室温で5時間インキュベートした。反応終了後、反応溶液を水に対して透析し、アビジン-PEIを得た。

## 【0048】

(実施例 1) ビオチン化eGFP複合体の細胞内への導入

3T3-SV-40細胞株をDMEM+10%FBS中で培養し、その培養上清に、

- (i) ビオチン-eGFP 200nM (6  $\mu$ g/ml)
- (ii) ビオチン-eGFP 200nM+アビジン 100nM+ビオチン-PEI 200nMの複合体

(iii) ビオチン-eGFP 200nM+アビジン-PEI 50nMの複合体

の3つのサンプルを添加・混合し、24時間後のeGFPの取り込みを蛍光により観察した。その観察結果を図2に示す。図2の観察結果からわかるとおり、(i) ビオチン-eGFP単独ではほとんど細胞内に取り込まれないのに対して、(ii) ビオチン-eGFP 200nM+アビジン 100nM+ビオチン-PEI 200nMの複合体、及び(iii) ビオチン-eGFP 200nM+アビジン-PEI 50nMの複合体ではどちらも効率的に細胞内に取り込まれていることが分かる。これは、(ii)及び(iii)では図1に示すようなカチオン化アビジン（複合体（A））が形成され、これがビオチン化eGFP（蛋白質（c））のキャリアーとして働いて、ビオチン化eGFPが効率的に細胞内に導入されるためであると考えられる。なお、蛍光観察は生細胞のままで、固定等は行っていない。

#### 【0049】

次に、以下の参考例4及び実施例2のようにして、蛋白質（a）としてプロテインGを、その蛋白質（a）をカチオン化するための重合体（b）としてPEI（分子量600：カチオン価 12）を、そして細胞内に導入する蛋白質（c）としてローダミン標識したマウスIgGに対するウサギIgG抗体（以下、ローダミン-rIgGという）を用いて実験を行った。

#### 【0050】

（参考例4）プロテインG-PEI複合体の調製

リコンビナントプロテインG（シグマ社製、カタログ番号P5170）に平均分子量600、カチオン価 12のPEI（WAKO社製、カタログ番号161-17831）を以下のようにしてアミド結合により結合させ複合体（A）を調製した。

#### 【0051】

リコンビナントプロテインG 5mgを終濃度0.5mg/mlになるように60mg/ml PEI溶液(pH 0.5)に溶解した。10mgのEDC（PIERCE社製）を前記プロテインG溶液に添加し、30秒間ボルテックスで攪拌した後に4℃で一晩放置した。RO水（逆浸透膜透過水）に対して透析を行うことにより未反応のPEIを除き、標記のプロテインG-PEIを得た。

#### 【0052】

(実施例 2) プロテイン G-PEI 複合体を用いる抗体の細胞内への導入

参考例 4 で調製したプロテイン G-PEI (複合体 (A)) と抗体 (蛋白質 (c)) との混合液を動物細胞の培養上清に添加して、プロテイン G-PEI をキャリアーとする抗体の細胞内への導入を検討した。導入する抗体としてはローダミン標識したマウス IgG に対するウサギ IgG 抗体 (以下、ローダミン-rIgG という) を用いた。抗体の細胞内への導入を細胞内のローダミンによる蛍光を観察することにより評価した。

【0053】

プロテイン G-PEI 及びローダミン-rIgG の濃度がそれぞれ 160nM 及び 587nM となるように、プロテイン G-PEI 溶液、ローダミン-rIgG 溶液及び無血清 DMEM 培地とを混合して全量を 50  $\mu$ l の混合溶液とし、4℃で一晩放置した。一方、ゼラチンコートしたガラスを 24 ウェル細胞培養用プレートの底に敷き、その上に Balb/c 3T3 (clone: A31-1-1) 細胞を 1 ウェルにつき約 20000 個ずつ播種して一晩放置した。次いで、プロテイン G-PEI 及びローダミン-rIgG を含有する前記混合溶液 50  $\mu$ l を 10% FCS 含有 DMEM で 8 倍希釈し、これを細胞培養液として用いて前記 Balb/c 3T3 を 4 時間培養した。その蛍光観察図を図 3 に示す。また、4 時間培養後に、培地を完全培地 (DMEM+10% FCS) に交換してさらに 24 時間培養した。その蛍光観察図を図 4 に示す。

【0054】

次に、以下の参考例 5 及び実施例 3 のようにして、蛋白質 (a) としてフナコシ社製の Anti-IgG(H+L), Rabbit, Goat-Poly clonal antibody (以下、Antibody(H+L) という) 及び Anti-IgG(Fc), Rabbit, Goat-Poly clonal antibody (以下、Antibody(Fc) という) を、その蛋白質 (a) をカチオン化するための重合体 (b) として PEI (分子量 600: カチオン価 12) を、そして細胞内に導入する蛋白質 (c) としてフナコシ社製 FITC-Anti-IgG(H+L), Rat, Rabbit-Poly clonal antibody (human serum absorbed) (以下、FITC-IgG という) を用いて実験を行った。

【0055】

(参考例 6) Antibody(H+L)-PEI 複合体及び Antibody(Fc)-PEI の調製

2.0mg/ml 濃度の Antibody(H+L) 500  $\mu$ l に 120mg/ml の PEI 溶液 (塩酸で pH5.0 に調

整)を500 $\mu$ l加え、3mgのEDCを添加して4℃で16時間反応させた。反応終了後、4℃の水に対して十分に透析した後、0.5Mヒドロキシルアミン溶液(pH7.0)に対して4℃で半日間インキュベートした。さらに水に対して十分な透析を行った後、PBSに対して1日透析してAntibody(H+L)-PEI複合体を得た。

また、Antibody(Fc)についても同様にして操作を行い、Antibody(Fc)-PEI複合体を得た。

#### 【0056】

(実施例3) Antibody(H+L)-PEI複合体又はAntibody(Fc)-PEI複合体を用いるFITC-IgGの細胞内への導入

FITC-IgGはウサギ由来の抗体であるので、Antibody(H+L)-PEI複合体及びAntibody(Fc)-PEI複合体のいずれとも結合すると考えられる。

#### 【0057】

以下の3つのサンプルを調製した。

- (i) FITC-IgG(100nM)
- (ii) FITC-IgG(100nM)+Antibody(H+L)-PEI複合体(100nM)の混合溶液
- (iii) FITC-IgG(100nM)+Antibody(Fc)-PEI複合体(100nM)の混合溶液

上記の3つのサンプルを1時間氷上で放置した。3T3-SV-40細胞株をDMEM+10%FBS中で培養し、その培養上清に上記サンプルを添加して培養4時間後のFITC-IgGの細胞内への取り込みを蛍光により観察した。その結果を図4に示す。

#### 【0058】

図4の観察結果からわかるとおり、サンプル(i)を用いた場合ではキャリアーとなる複合体が存在しないため、FITC-IgGは細胞内にほとんど取り込まれていない。これに対して、サンプル(ii)及び(iii)を用いた場合では、FITC-IgGが細胞内に効率的に取り込まれていることが分かる。なお、蛍光観察は生細胞のままで行っており、固定等は行っていない。

#### 【0059】

##### 【発明の効果】

本発明の方法によれば、任意の蛋白質を効率的に細胞内に導入することができる。また、本発明の方法では、カチオン性重合体によりカチオン化された蛋白質

又はペプチドをキャリアーとして用いており、細胞内に導入しようとする蛋白質は直接カチオン化されないで、そのネイティブの構造と機能を維持したまま目的とする蛋白質を細胞内に導入することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明で用いられる蛋白質 (a)、重合体 (b) 及び蛋白質 (c) との関係を示す図である。(i)は、蛋白質(a)としてプロテインG又はAを、重合体(b)としてPEIを、蛋白質(c)として抗体を用いた例である。(ii)は、蛋白質(a)としてアビジンを、重合体(b)としてPEIを、そして蛋白質(a)と蛋白質(c)との間のスペーサーとしてをビオチンを用いた例である。

【図 2】

実施例 1 の結果を示す蛍光観察図である。(i) はビオチン-eGFPを、(ii) はビオチン-eGFP+アビジン+ビオチン-PEIを、そして (iii) はビオチン-eGFP+アビジン-PEIを用いた場合の結果を示す。

【図 3】

ローダミン-rIgGの細胞内への取り込みを蛍光により観察した図である。(a) はプロテイン G-PEI及びローダミン-rIgGを含む培地で4時間培養後の観察図であり、(b) はプロテイン G-PEI及びローダミン-rIgGを含む培地で4時間培養した後、培地転換してさらに24時間培養後の観察図である。

【図 4】

FITC-IgGの細胞内への取り込みを蛍光により観察した図である。(i)はFITC-IgG(100nM)を用いた場合の、(ii)、(iii)はそれぞれFITC-IgG(100nM)+Antibody(H+L)-PEI複合体(100nM)の混合溶液、(iii) FITC-IgG(100nM)+Antibody(Fc)-PEI複合体(100nM)の混合溶液を用いた場合の実験結果である。

【書類名】 図面

【図 1】

(i)



抗体 (蛋白質 (c))



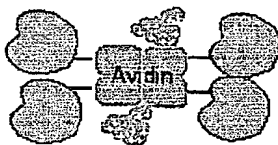
プロテイン A 又は G (蛋白質 (a))



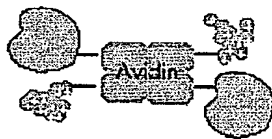
PEI (重合体 (b))

(ii)

アビジン-PEI



ビオチン-PEI



— : ビオチン (スペーサー)



PEI (重合体 (b))



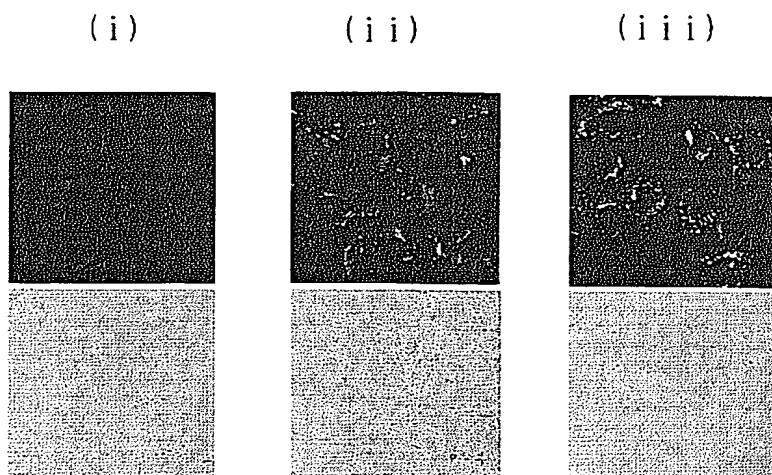
蛋白質 (c)



アビジン (蛋白質 (a))

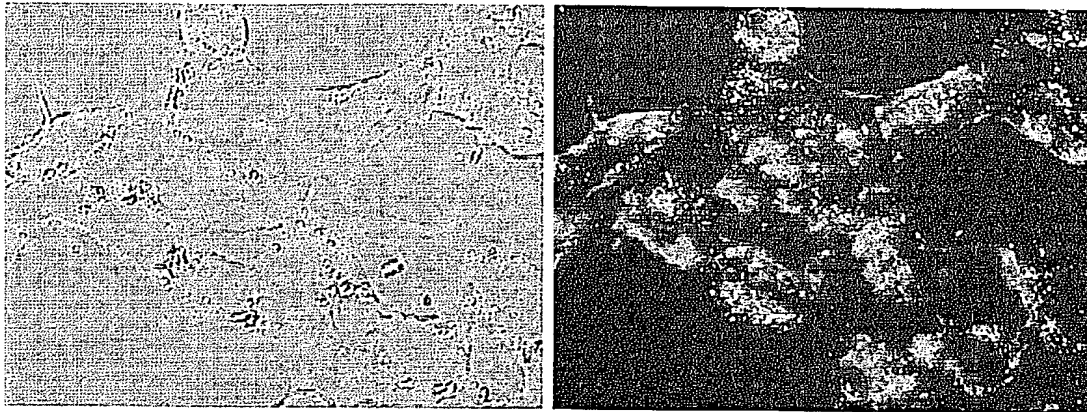


【図 2】

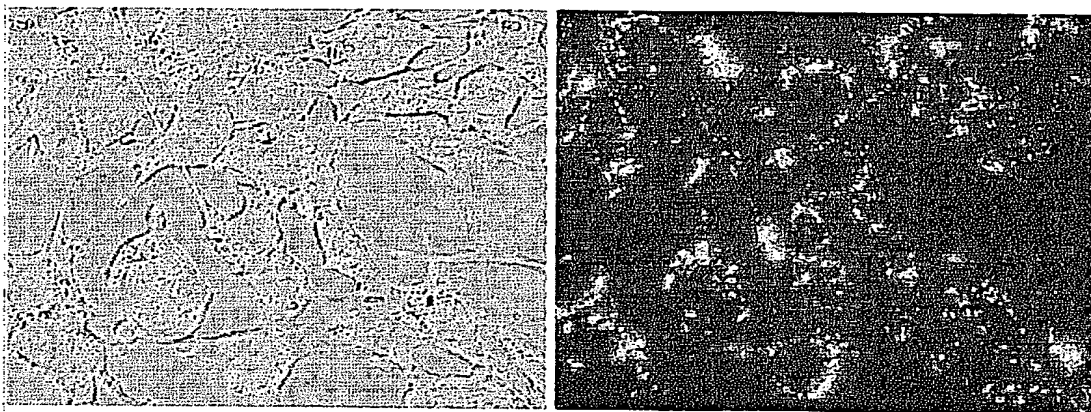


【図 3】

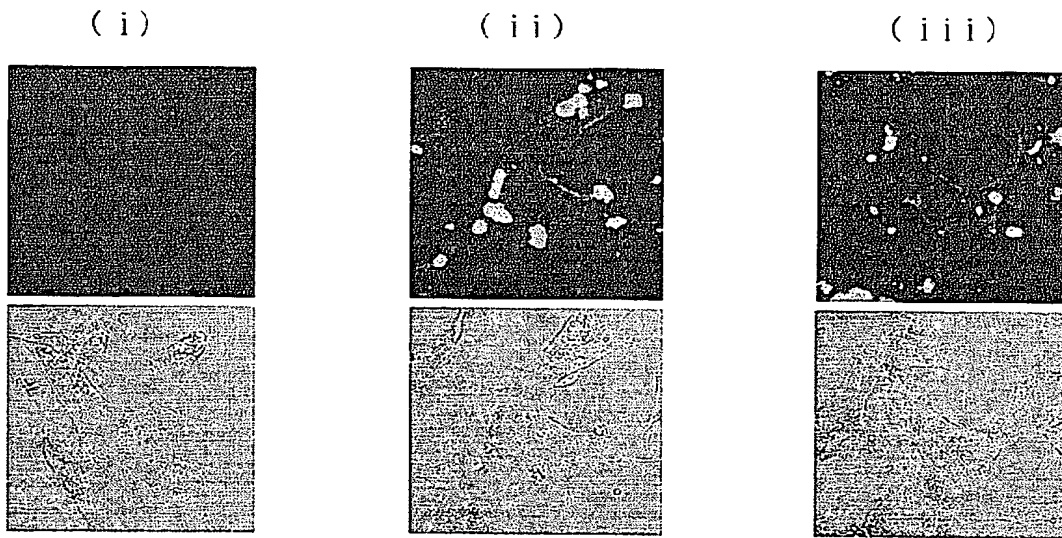
( a )



( b )



【図 4】




【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞内に蛋白質を導入することができる複合体、及び、該複合体を用いて、時間的・量的に制御でき、なおかつ効率的に蛋白質を細胞内へ導入する方法を提供する。

【解決手段】 蛋白質又はペプチド（a）と 2 を超えて 3 万以下のカチオン価を有する重合体（b）とが結合した複合体（A）を蛋白質又はペプチド（c）のキャリアーとして用いて、該蛋白質又はペプチド（c）を細胞内に輸送することを特徴とする蛋白質又はペプチドの細胞内導入方法。

【選択図】 なし



特願 2 0 0 2 - 2 8 7 2 8 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 4 6 2 8 ]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 1 2 月 6 日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市中央区高麗橋 4 丁目 1 番 1 号

氏 名

株式会社日本触媒



Creation date: 02-27-2004  
Indexing Officer: RHAMENYIMANA - RAMADHANI HAMENYIMANA  
Team: OIPEBackFileIndexing  
Dossier: 10099387

Legal Date: 02-17-2004

No.	Doccode	Number of pages
1	FRPR	52

Total number of pages: 52

Remarks:

Order of re-scan issued on .....